



**Deteccção do Vírus do Papiloma Humano por PCR em tempo real:
Relevância para Medicina Legal**

Daniela Cochicho Tavares de Sousa

Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

2014

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 23 de Setembro de 2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Detecção do Vírus do Papiloma Humano por PCR em tempo real: Relevância para Medicina Legal

Daniela Cochicho Tavares de Sousa

Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

Dissertação Orientada

Orientador: Professor Doutor Pedro Simas

Co-Orientador: Doutora Paula Gameiro

Tutora de Projecto: Dra. Maria do Carmo Ornelas

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

RESUMO

Introdução: O presente estudo visa demonstrar a importância das técnicas *in house* com relevância para o PCR em tempo real, na detecção e genotipagem do VPH e o seu contributo na Medicina Legal (ML). As infecções mais comuns em vítimas de violência sexual são a clamídea, gonorreia, sífilis e trichomonas, existindo igualmente o risco de contrair infecções virais, nas quais se destaca a infecção pelo VPH. Esta apresenta uma elevada infecciosidade com impacto ao nível da prevalência na população em geral. As infecções sexualmente transmissíveis (IST) em contexto ML são indicadores biológicos nos casos de abuso evidente ou declarados e a manifestação da infecção em crianças, idades não sexualmente activas, pode ser sugestiva quanto ao modo de transmissão ocorrido. A detecção do ADN viral e identificação do genótipo específico poderá contribuir no esclarecimento de situações com potenciais implicações sócio-médico-legais.

Objectivo: Implementação, optimização e validação de um ensaio de PCR em Tempo Real para a detecção qualitativa do VPH (rastreamento) em amostras biológicas (esfregaços e biópsias) do colo. Demonstrar o desempenho do ensaio face aos critérios estabelecidos, tendo em conta normas científicas e o estado arte. Possibilitar a identificação do genótipo da amostra positiva para o ADN do VPH.

Metodologia: O desenho do ensaio conteve diferentes etapas de preparação: Extração do ADN, adaptação das condições de PCR e interpretação analítica do resultado produzido (positivo ou negativo). Implementação do programa de monitorização e controlo da qualidade pela caracterização do método de ensaio nas suas variáveis de sensibilidade e especificidade analítica. Determinação dos valores preditivos positivo e negativo numa população específica analisada.

Resultados: O ensaio desenvolvido permite a detecção de cerca de 30 genótipos diferentes do vírus do papiloma humano com limite de detecção 5 UI/ml para os genótipos mais prevalentes VPH16 e VPH18. O desempenho do ensaio quanto à sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, foi calculada para situações de lesões maiores ou iguais a CIN 2+ (Classificação *Bethsheda*) onde a melhor estimativa, foi de 85.6%, 58.1%, 33.7% e 94.2%, respectivamente.

Conclusões: A metodologia de ensaio laboratorial desenvolvida proporciona robustez, fiabilidade e exactidão no resultado que produz. Disponibiliza inovação (tecnologia e económica) face as técnicas comerciais existentes na detecção deste vírus e constitui uma mais-valia contexto ML.

Palavras-chave: PCR em tempo real, VPH, Medicina Legal

ABSTRACT

Introduction: This study aims to demonstrate the importance of the molecular biology techniques, especially for *in house* real-time PCR, used for HPV detecting and genotyping and their contribution in Forensic Medicine (FM). The most common infections in victims of sexual violence are chlamydia, gonorrhea, syphilis and trichomonas, and there is also the risk of acquire viral infections, such HPV infection, that shown a high infectivity with impact on the prevalence in the general population. Regarding to FM context the sexually transmitted infections (STIs), are biological indicators in cases of obvious or declared abuse and the manifestation in children, ages normally with no sexual activity, may be suggestive about the way the transmission occurred. The detection of HPV DNA and identification of the specific genotype may help to clarify some situations that may have social, medical and legal implications.

Objective: Optimization, implementation and validation of a PCR test in Real-Time for qualitative detection of HPV, in biological samples of cervix (smears and biopsies) associated with the presence of HPV. Demonstrate the performance of the assay compared with established scientific standards criteria, and a state of art. Enable the genotype identification of positive sample for HPV DNA.

Methodology: The test layout had different stages of preparation: Extraction of biological sample, adjustment of the amplification reaction conditions and analytical interpretation of the result produced for the presence of HPV DNA (positive or negative). Implementation of a monitoring program and quality control. Characterization of the test method regarding its variables analytical on sensitivity and specificity. Determination of positive and negative predictive values in a specific population under analysis.

Results: The test results proved to be reliable for the detection of about 30 different genotypes of the human papillomavirus with a detection limit of 5 IU / ml for most prevalent genotypes HPV16 and VPH18. The performance of the test regarding its sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value has been calculated for lesions situations greater than or equal to CIN 2+ (*Bethsheda* Classification) where the best estimate was 85.6%, 58.1%, 33.7% and 94.2%, respectively.

Conclusions: The methodology developed in this laboratory test provides strength, reliability and accuracy on the result produced. It provides innovation (technology and economy) in relation to existing commercial techniques for detection of this virus and can be applied in required situations on FM context

Keywords: PCR in real-time, HPV, Forensic Medicine

AGRADECIMENTOS

“A virus is a piece of bad news wrapped up in protein”

Sir Peter Medawar Prémio Nobel 1960

No sentido de responder ao desafio com a perspectiva de explorar, aprofundar e dinamizar conhecimentos, tive no Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses a oportunidade de desenvolver e consolidar aptidões, onde o contacto com grupos multidisciplinares permitiram uma formação dinâmica e enriquecida.

Agradeço ao corpo científico envolvido por toda a colaboração, dedicação e disponibilidade,

Instituto de Medicina Legal de Lisboa, Presidente do Conselho de Mestrado Professor Doutor Jorge Costa Santos,

Faculdade de Medicina de Lisboa, Orientador Professor Doutor Pedro Simas,

Instituto Português de Oncologia de Lisboa , Co-Orientador Professora Doutora Paula Gameiro

Dedico à Dra. Carmo

Na partilha do saber. É enorme o privilégio, de ter como referencia profissional e pessoal, o Instituto Português de Oncologia de Lisboa, ao trabalhar desde 2005 no Laboratório de Virologia à tutela Dra. Carmo Ornelas.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 3 |
| ABSTRACT | 5 |
| AGRADECIMENTOS | 6 |
| ÍNDICE | 7 |
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 1.1 Contributo da detecção do VPH em contexto ML. | 8 |
| 1.2 A detecção do ADN do VPH em Laboratório..... | 9 |
| 1.3 Implementação e Validação de ensaios <i>in house</i> em laboratório. | 12 |
| 2. OBJECTIVOS | 14 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 3.1 Extracção do ADN do VPH | 14 |
| 3.2 Preparação do Controlo Positivo | 15 |
| 3.3 Amplificação e Detecção do VPH..... | 15 |
| 3.4 Programa de Controlo de Qualidade..... | 18 |
| 3.5 Validação Analítica | 20 |
| 3.6 Validação Clínica..... | 24 |
| 4. RESULTADOS | 26 |
| 4.1 Análise <i>in sílico</i> | 26 |
| 4.2 Optimização do protocolo de amplificação | 27 |
| 4.4 Precisão do ensaio | 30 |
| 5. Discussão..... | 36 |
| 6. Conclusões | 38 |
| 7. Referências | 39 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contributo da detecção do VPH em contexto ML.

“A ciência teve origem na fusão de duas antigas tradições: a do pensamento filosófico, a qual teve origem na Grécia Antiga e a dos ofícios especializados que começou ainda antes e floresceu na Europa medieval. A filosofia contribuiu com os conceitos da ciência e os ofícios contribuíram com as ferramentas. As revoluções e evoluções científicas são despoletadas por instrumentos.” Peter Galison, 1997

A detecção do VPH é utilizada em situações com implicação sócio-medico-legal, maioritariamente nos casos de abuso sexual evidentes ou declarados e nos casos de abuso sexual infantil (ASI). A identificação de uma infecção sexualmente transmissível (IST) constitui uma evidência do possível abuso sexual, que requer uma abordagem de avaliação multidisciplinar na tentativa de esclarecer o modo de transmissão da infecção e de intervenção clínica para o tratamento e acompanhamento da doença. (guidelines OMS)

A infecção com o VPH é das IST a que apresenta uma maior taxa de transmissão entre os mais jovens e sexualmente activos e em ambos os sexos. A maioria das infecções é transmitida por contacto directo entre pele-pele ou mucosa-mucosa. Estudos epidemiológicos demonstram que a principal via de transmissão da infecção anogenital é por via sexual, uma vez que, mulheres que não são sexualmente activas a infecção é pouco comum. [18]

O diagnóstico destas infecções em crianças, idades não sexualmente activas, são sugestivas quanto ao modo de transmissão ocorrido, exige uma análise complexa, pois temos de ter sempre presente a transmissão perinatal tendo a mãe como principal vector. Existem dados publicados que evidenciam este modo de transmissão e já foram igualmente descritos casos por auto e hetero inoculação ou por objectos contaminados. (Syrjanen 2000) Aproximadamente metade das infecções a VPH nas crianças ocorre na cavidade oral ou no tracto genital e surgem numa taxa de 10% e 2%, respectivamente. (Syrjanen 2010) Esta associação vem descrita desde 1986, onde as lesões encontradas nas crianças eram semelhantes às encontradas nos adultos. (Rock 1986) Há autores que defendem a possível

correlação entre o tipo de VPH presente e o modo de transmissão ocorrido, mas os dados revelaram ser inconsistentes, mesmo quando detectados os genótipos VPH 16 e VPH 18 (Sinclair 2005) (Mosciki 1996), sendo a detecção laboratorial apenas indicativa da presença do vírus e não pode ser passível de nenhuma situação em concreto. Em geral, a presença de manifestações clínicas do VPH em crianças, estão associadas a modos de transmissão vertical com a mãe como principal vector, onde os genótipos mais prevalentes são o VPH2, VPH6, VPH11, VPH16 e VPH18.

1.2 A detecção do ADN do VPH em Laboratório

O VPH é morfologicamente um vírus pequeno com 55nm de diâmetro, sem invólucro, com cápside proteica de simetria icosaédrica que envolve um o genoma viral a ADN. (Campo 2006) O genoma com 8000 pares de bases (pb) é de cadeia dupla circular. Contém três regiões funcionais: Região *Early*, *Late* e *Long Control Region (LCR)*. A região *Early* contém os genes de regulação **E6**, **E7**, **E1**, **E2**, **E4** e **E5**. A Região *Late* contém os genes estruturais **L1** e **L2**, a Região *LCR* ou região reguladora com um tamanho de 900 pb inclui a origem da replicação (*ori*) e os elementos amplificadores da transcrição (*enhancers*). (Campo 2006)

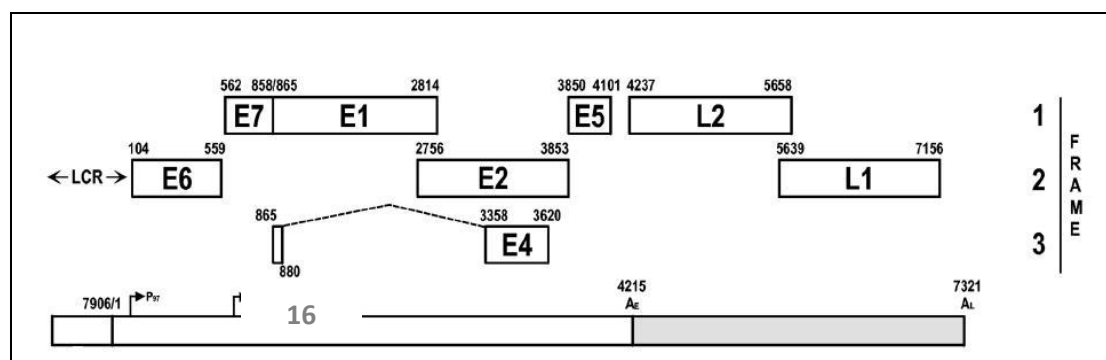


Figura 1 - Representação da organização do genoma completo do VPH16. LCR região reguladora. Genes da região *early* que codificam as proteínas precoces: E6, E7, E1, E2, E4, E5. Genes da região *late* que codificam os genes tardios: L2 e L1. (Baker 2006)

Tem apenas uma cadeia codificante, com 7 *open reading frames* (ORF) que codificam diversas proteínas (Figura 1). As proteínas precoces e proteínas tardias do VPH. (Baker 2006) Os transcritos que codificam estas proteínas estão presentes na camada basal e suprabasal do

epitélio na primeira fase do ciclo replicativo e são proteínas que interagem com a maquinaria celular do hospedeiro para permitir a replicação e transcrição viral. (Laimins 2009) Alguns autores descrevem que a ORF do gene E6 poderá estar por vezes ausente, nomeadamente no tipo VPH 101, 103 e 108. (Nobre 2009) As duas proteínas, E6 e E7, são consideradas como as proteínas principais dos vírus oncogénicos, onde aparentam ter um papel fundamental na imortalização e transformação celular. (Dillner 2009)

Os diferentes VPH são referenciados como “tipos”. Todos partilham a mesma organização genómica e no mínimo 5 genes homólogos. A região ORF do gene L1 é a mais conservada no genoma e a eleita na identificação de novos genótipos. (Villiers 2004) É considerado um novo genótipo de VPH se na clonagem do genoma completo da região ORF do gene L1 apresentar uma homologia em 90% com o genótipo de VPH mais próximo filogeneticamente. Se variar entre 90%-98% define-se como subgenótipo e os que apresentem uma homologia superior a 98% são definidos como variantes do genótipo. (Villiers 2004)

Pertencem à família *Papillomaviridae*. Actualmente, foram já isolados cerca de 120 genótipos (Villiers 2009), que baseados numa análise filogenética foram classificados em cinco géneros: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu*; nomenclatura proposta por *E. Villiers* segundo as homologias encontradas no genoma (Figura 2).

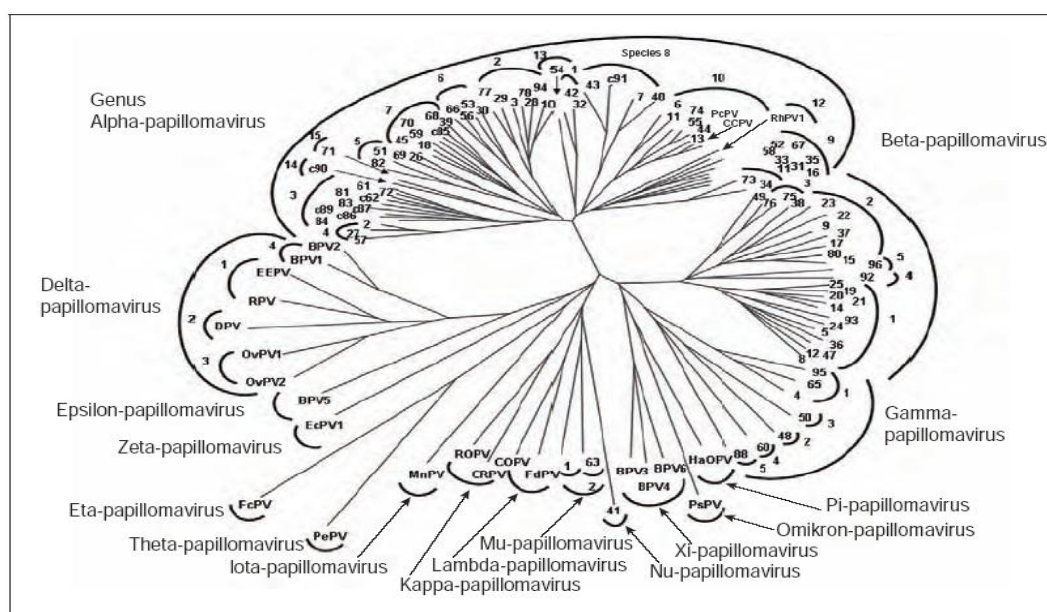


Figura 2 - Árvore filogenética dos genótipos de VPH descritos. Nomenclatura proposta *Ethel-Villiers*. O número terminal presente em cada braço identifica o tipo de VPH, os números associados à letra “c” são considerados como candidatos a novo tipo de VPH. Todas as outras abreviaturas referem-se aos

Papilomas dos animais. Os semi-círculos externos maiores representam os géneros, denominados pelas letras do alfabeto grego. Os números dos semi-círculos internos denominam a espécie do tipo de Papilomavírus. (Villiers 2004)

A detecção do VPH em laboratório é registada desde 1983-84. A descrição do papel dos tipos VPH 16 e 18 no desenvolvimento do cancro do colo do útero cooperou para o rápido desenvolvimento de metodologias de detecção deste vírus em laboratório. (Lorincz 2011)

A detecção dos agentes virais em laboratório baseia-se essencialmente em dois métodos, método indirecto e método directo. No caso particular do VPH, a detecção indirecta é morosa e onerosa, pois o vírus só replica em células diferenciadas, que actualmente em laboratório são obtidas a partir de *Raft Cultures* tornando a obtenção do antigénio dispendiosa (Clare Davy 2005). Os métodos directos permitem a detecção e quantificação do agente viral e são uma mais-valia para a detecção deste vírus em laboratório. (Day 2003)

A detecção directa do VPH é maioritariamente processada por técnicas de biologia molecular, onde as mais relevantes são: *Nucleic Acid Sequence Base Amplification* (NASBA), Captura Híbrida (CH) e *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Revolucionaram face às técnicas iniciais que careciam de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. (Dillner 2009) As metodologias assentam na quimioluminescência com a amplificação de sinal (CH) ou na química da actividade enzimática com amplificação de uma região conservada do genoma do vírus com a utilização de *primers* consenso (PCR). (Lorincz 2011)

Devido à grande versatilidade e sensibilidade da técnica de PCR, foram desenvolvidos uma série de protocolos, optimizados para diferentes *primers*, que amplificam maioritariamente a região L1 do genoma. Inicialmente *Walboomers* e *Manos* (Snijders 1990) (Walboomers 1995) desenvolveram dois *set* de *primers* (GP05/GP06 e MY09/MY10), que amplificam um fragmento de 125pb e 450pb, respectivamente. A amplificação com o *set* MY09/MY10 é o único que permite detectar o VPH e sequencialmente identificar o genótipo presente, pela utilização de enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Mais tarde, foram também descritos o *set* PGMY (Gravitt PE 1992) e SPF10 (Kleter 1998).

Dada a complexidade de execução da técnica de PCR convencional em rotina de laboratório, pela amplificação do VPH com *primers* e detecção em gel de agarose, a necessidade de mudança tornou-se premente. Actualmente, a introdução de técnicas de PCR em Tempo Real na detecção deste vírus tem vindo a reinventar toda uma optimização das metodologias anteriores, uma metodologia mais robusta e com grandes vantagens ao nível de fluxo de trabalho e manipulação de amostras.

1.3 Implementação e Validação de ensaios *in house* em laboratório.

A optimização de técnicas de PCR em Tempo Real *in house* e a sua implementação em rotina laboratorial requer procedimentos de validação para garantir a qualidade e integridade dos resultados emitidos. Estes procedimentos estão descritos em diversas instruções certificadas que revelam um papel cada vez mais importante para o sucesso da aplicação das técnicas de PCR em rotina de laboratório. (Bustin 2009)

Apesar das grandes vantagens da reacção de PCR relativamente a outros métodos, alguns problemas têm sido discutidos. São técnicas muito sensíveis a qualquer contaminação, gerando facilmente falsos positivos. É particularmente sensível às inúmeras variáveis que podem influenciar o sucesso da reacção de amplificação.

Um programa de qualidade eficiente e funcional tem que detectar quais as etapas de todo o ensaio que se encontram mais vulneráveis à ocorrência de oscilações e que influenciam o resultado esperado. (Bustin 2009) Nos ensaios com ácidos nucleicos há uma série de operações que constituem potenciais fontes de erro que estão descritas no quadro 1. (Day 2003)

Quadro 1 - Principais fontes de erro nas diferentes etapas dos ensaios com ácidos nucleicos (Day 2003)

| <i>Procedimento Técnico</i> | <i>Erro associado</i> |
|-----------------------------|--|
| Extracção ADN | Degradação |
| | Componentes inibitórios ou contaminantes |
| | Extracção incompleta, erro de amostra |
| | Perda do analito |
| Amplificação | Pouca sensibilidade |
| | Não específico |
| | Inibição |
| | Contaminação |
| | Degradação da enzima |
| Detecção | Não específica |
| | Falha no enzima |
| | Falha na calibração |

A confirmação através da apresentação de evidências objectivas, que permitam provar que o procedimento desenhado funciona como o esperado e alcança o resultado pretendido estabelece a validação do ensaio, onde os principais componentes de evidência são: controlo de qualidade, ensaios de proficiência, validação da competência, calibração de instrumentos e correlação com os dados clínicos (Day 2003).

As características de especificidade e sensibilidade são intrínsecas dos testes. A determinação destes parâmetros permite a comparabilidade entre ensaios. A validação analítica determina o valor de sensibilidade e especificidade do ensaio desenhado e vai focar diferentes parâmetros que possibilitam a prevenção de riscos, detectar desvios, corrigir erros, melhorar a eficiência e assegurar resultados precisos e exactos. Define-se como a sensibilidade analítica, nos ensaios qualitativos, a capacidade do teste para obter verdadeiros positivos e a especificidade analítica pela capacidade do método para obter verdadeiros negativos, por comparação ao método de referência. (Day 2003) A validação clínica intenta a correlação dos resultados obtidos com os

dados clínicos. A aplicação do ensaio numa população específica permite a elaboração de uma análise estatística com a determinação dos parâmetros de Sensibilidade e Especificidade clínica, uma mais-valia na validação do ensaio desenvolvido.

2. OBJECTIVOS

Objectivo primário:

- 1- Implementação, optimização e validação da metodologia *in house* desenvolvida.
- 2- Demonstrar o desempenho do ensaio face aos critérios científicos estabelecidos
- 3- Determinar o genótipo dos diferentes tipos de VPH detectados.

Objectivo secundário:

- 1- O contributo da detecção do VPH em situações de abuso sexual

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extracção do ADN do VPH

A extracção a partir de células utiliza uma metodologia morosa e com uma série de etapas que tem de ser cumpridas integralmente para garantir a melhor eficácia do processo total. O número de células iniciais apresenta um valor mínimo para se conseguir obter uma quantidade de ADN suficiente para que seja possível realizar os passos de amplificação e detecção do produto específico. O *kit* utilizado (*Qiamap MiniElute Virus Kit, QIAGEN*), específico para a extracção viral em soro e plasma, foi optimizado para a extracção de ácidos nucleicos a partir de células ou biópsias. A partir de um mililitro de amostra (esfregação em meio de transporte) obtêm-se, por meio de centrifugação (8000g: 10 minutos), um *pellet* visível que em média, por amostra, equivale a uma quantidade de ADN total que pode variar entre 15-2455 ng e o grau de pureza médio (razão A260/A280) obtido varia entre 1,5 e 2,3. A preparação inicial de cada amostra é específica do tipo de natureza do produto. Todos os passos de preparação e extracção estão descritos no ANEXO 1.

3.2 Preparação do Controlo Positivo

O Controlo positivo utiliza linhas celulares imortalizadas e infectadas com VPH: células *Caski*, *SiHa* e *HeLa* e dois plasmídeos de VPH 16 e VPH 18 adquiridos externamente pela *National Institute for Biological Standards & control* (NIBSC) (NIBSC 2010), (NIBSC 2010). As características gerais das linhas celulares e plasmídeos, procedimentos de preparação e conservação estão descritos no ANEXO 2.

3.3 Amplificação e Detecção do VPH

As condições de reacção foram desenvolvidas e optimizadas segundo o artigo de Payan *et al* (Payan 2007). Os *primers* utilizados (SPF10 modificados) estão descritos no Quadro 2. Para serem utilizados em PCR em Tempo Real apresentam uma modificação em 4 bases no terminal 5' dos *primers* originais permitindo a hibridação a 60°C necessária em PCR em Tempo Real. Todos os passos de preparação do *set* de *primers* encontram-se descritos no ANEXO 3. O *set* de *primers* é constituído por quatro oligonucleótidos *forward* e três oligonucleótidos *reverse* como apresentado no quadro 2

Quadro 2 - Constituição dos oligonucleótidos do *Set* de *Primers* SPF10

| FORWARD | T | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | T |
|---------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| HP1E | 5' | A | A | C | C | G | G | G | A | G | G | G | G | G | A | G | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | - | 3' |
| HP1F | 5' | A | T | A | A | C | G | G | A | G | G | G | G | G | A | G | G | A | A | A | C | A | A | A | A | A | - | 3' |
| HP1G | 5' | A | A | C | C | G | G | G | A | G | G | G | G | G | A | G | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | - | 3' |
| HP1H | 5' | A | A | C | C | G | G | G | A | G | A | A | G | G | A | G | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | - | 3' |
| REVERSE | T | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | T |
| HP2C | 5' | C | C | C | C | G | A | G | A | A | A | A | A | A | G | A | A | A | C | A | C | A | A | C | A | A | A | 3' |
| HP2D | 5' | A | A | A | A | G | C | G | A | A | A | A | A | A | G | C | A | C | A | C | A | A | A | C | A | A | A | 3' |
| HP2E | 5' | C | C | C | C | T | A | G | T | A | T | C | A | A | C | T | A | C | A | G | T | A | A | C | A | A | A | 3' |

Legenda: A cor Verde representa os primers originais SPF10; a vermelho as bases modificadas nos primers SPF10 originais; I representa as bases degeneradas (iosinadas); as 4 bases acrescentadas no terminal 5' dos SPF10 modificados assinaladas.

A reacção de PCR é processada em sistema fechado com detecção em tempo real da fluorescência emitida, usando o equipamento 7900 *Fast* da *Applied Biosystems*. A reacção é preparada numa sala pré PCR com a elaboração de uma mistura de reacção contendo solução tampão, cloreto magnésio, enzima *taq polimerase*, bases de nucleótidos (dNTPs) e o corante SYBR GREEN. A esta Mistura de Reacção são adicionados os *primers* SPF10 (*forward* e *reverse*) preparados, bem como o enzima *uracil DNA-glycosylase* (UDG). Foram utilizadas as concentrações mínimas necessárias de cada constituinte sem comprometer a eficiência da reacção. Todo o método de preparação da mistura de PCR encontra-se descrito no ANEXO 5.

O controlo interno de amplificação é realizado em reacção independente, recorrendo a metodologia validada por *Swinkels* (Swinkels 2002). A amplificação e detecção são igualmente realizadas em sistema de detecção em tempo real da fluorescência, em simultâneo com a detecção do VPH. A metodologia de detecção usada compreende o uso de *primers* (*forward* e *reverse*), específicos para amplificação de um fragmento de 81pb do gene humano da albumina, usando sondas de hidrólise *Taqman*. A descrição, preparação do *set* de *primers*, sonda e mistura de reacção encontram-se no ANEXO 4.

No equipamento a reacção de PCR em Tempo Real foi efectuada segundo o programa descrito no Quadro 3.

Quadro 3 - Programa de Amplificação e Detecção do VPH e gene Albumina

| <i>Segmentos</i> | | <i>Temperatura (°C)</i> | <i>Tempo (segundos)</i> |
|------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1º Segmento | 1 Ciclo | 50 | 120 |
| | | 95 | 600 |
| 2º Segmento | 50 Ciclos | 95 | 30 |
| | | 60 | 60 |
| 3º Segmento | 1 Ciclo Dissociação | 95 | 15 |
| | | 60 | 30 |
| | | 95 | 15 |

A reacção de amplificação e detecção do produto é realizada em 3 segmentos, com uma duração aproximada de duas horas e meia. O passo inicial (1º segmento) decorre a uma temperatura de 50°C, a qual permite a actividade da enzima UDG durante 2 minutos. Este enzima faz diminuir a formação de produto não específico e possíveis contaminações que possam ocorrer durante a reacção. (Kleter 1998)

No segundo segmento, a cadeia dupla de ADN é desnaturada a 95°C durante 60 segundos. Os *primers* utilizados hibridam a uma temperatura de 60° e durante 60 segundos, à medida que os *primers* se ligam, ocorre a elongação pela *taq polimerase*. Este segmento é repetido durante 50 ciclos, o que permite a amplificação do fragmento alvo presente na cadeia de ADN. A detecção do produto específico formado é efectuado em simultâneo com a reacção de amplificação, o sinal fluorescente é detectado em tempo real. Utilizou-se um corante não específico como método de detecção – SYBR GREEN – que é aplicado inicialmente na preparação da Mistura de Reacção de PCR. Ao longo da reacção o corante intercala com toda a cadeia dupla de ADN formado, seja ele específico ou não específico. Há medida que a reacção ocorre, o sinal emitido aumenta com o aumento do produto específico produzido. (Invitrogen 2008)

A especificidade do ensaio com esta química de detecção vai depender da análise da curva de dissociação (3º segmento) que permite discernir entre produto específico do não específico, pelos diferentes valores obtidos de temperatura de dissociação dos produtos presentes na reacção. Esta análise é efectuada automaticamente pelo *software* do equipamento com a versão SDS V2.4.

A temperatura de dissociação é característica de cada produto e define-se como a temperatura a qual metade da cadeia de ADN já está desnaturada. Dependem essencialmente do tamanho, da constituição em GC da sequência de nucleótidos, do grau de complementaridade com a cadeia original, concentração final e da própria constituição do *buffer* utilizado na reacção. Considera-se que da amplificação se obtêm produto específico se a amostra em estudo apresenta uma temperatura de dissociação $73^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

3.4 Programa de Controlo de Qualidade

De acordo com literatura de referência *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) (Bustin 2009) é necessário proceder uma validação dos ensaios previamente à sua implementação em laboratório, respeitando uma série de pontos descritos. Foi então, desenhada uma metodologia de validação e monitorização para o ensaio optimizado na detecção do ADN do VPH em laboratório que se encontra descrito no Quadro 4.

Quadro 4- Metodologia de Implementação e Monitorização estabelecida para o ensaio de PCR em Tempo Real para a detecção do VPH em laboratório

| Implementação | Descrição de Operações |
|--|---|
| 1. Validação do método | <ul style="list-style-type: none"> • Validação analítica • Validação no contexto Clínico |
| 2. Programa de controlo de qualidade | <ul style="list-style-type: none"> • Descrição da metodologia (CQI e AEQ) no procedimento associado ao ensaio. |
| Monitorização do teste | Descrição de Operações |
| ✓ Analise e monitorização do CQI | <p>Processamento de controlos em cada ensaio realizado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Controlo Positivo (diluição logarítmica seriada), • Controlo de Negativo de Extração, • Controlo Negativo de Amplificação |
| ✓ Análise periódica da garantia da competência dos reagentes | Registo de lote de reagentes |
| ✓ Manutenção e calibração do instrumento | Registo de Manutenções e Calibrações dos diferentes equipamentos utilizados. |
| ✓ Avaliação externa da qualidade | Participação no controlo externo da qualidade: WHO LabNet, INSTAND, NEQAS, QCMD |
| ✓ Registo de não conformidades ou ocorrências | Registar ocorrências e não conformidades |
| ✓ Validação do Resultado | Interpretação do resultado laboratorial |

3.5 Validação Analítica

3.5.1 Construção da Curva de Calibração

A implementação de uma curva de calibração no ensaio permite obter uma avaliação analítica de cada corrida processada e devem ser usados os valores de coeficiente de variação (CV), obtidos através do programa de controlo qualidade interno (CQI), para verificação do desempenho do método. Com a indicação do erro de medição, expressamos, de forma quantitativa e mais precisa, as limitações que o nosso processo de medição introduz na determinação dos valores da grandeza.

A monitorização é feita com base nos valores de *Ct* (*Cycle Threshold*) obtidos para determinada concentração conhecida do controlo positivo (amostra com ADN VPH). A sua avaliação permite calcular a eficiência da reacção de PCR, o respectivo coeficiente de correlação obtido entre os valores de *Ct* e o logaritmo das concentrações conhecidas de VPH, bem como o limite de detecção para cada ensaio processado.

A curva de calibração é obtida por diluições logarítmicas em série da concentração. Devem ser preparados entre cinco ou mais diluições seriadas em 10 vezes (diluições logarítmicas) para se obter no mínimo cinco pontos diferentes da concentração inicial do produto. Os valores obtidos de *Ct* em cada diluição são representados num gráfico em função do logaritmo da concentração: estes são inversamente proporcionais, podendo aplicar-se a regressão linear ($Y=mx+b$).

Para se ter uma eficiência de 100% na reacção de PCR é necessário que em cada ciclo de amplificação seja produzida uma cópia completa do alvo específico. A eficiência da reacção de PCR é calculada com base no declive da recta, usando a seguinte equação (***Eficiência = 10 (-1/declive) - 1***). Para uma reacção de PCR com uma eficiência de 100%, o declive da curva de calibração será aproximadamente -3,33 ($100=100\%=10 (-1/-3,33) -1$). Um declive entre -3,9 e os -3,0 (80-110%) é geralmente aceite. A eficiência do PCR pode ser afectada por uma série de factores, incluindo o tamanho e estrutura do fragmento amplificado, desenho dos

primers, a escolha da química de detecção e a presença de componentes promotores ou inibitórios.

O coeficiente de determinação (R^2) é uma medida da proporção de variabilidade que um conjunto de dados apresenta e ao qual se aplica um determinado modelo estatístico, sendo igual ao quadrado do valor de coeficiente de correlação, que neste caso é calculado através de regressão linear. Neste estudo, esta medida é influenciada essencialmente pelo rigor da pipetagem (operador) e pela estabilidade do controlo usado. A literatura de referência indica que este valor deve ser maior ou igual a 0.998. Se os valores de R^2 forem menores a 0.998, temos indicação de que os dados estão menos relacionados com a linha de regressão, devido aos erros possíveis. (Day 2003), (J.C.A Frederick 2006)

A avaliação da sensibilidade de cada corrida é efectuada através da amplificação do controlo de menor valor e assim estabelecer o limite de detecção para cada ensaio processado.

A utilização de painéis de programas de Avaliação Externa de Qualidade, mais concretamente da OMS (WHO LABNET), permitiu verificar qual a sensibilidade analítica real do ensaio de PCR em Tempo Real, uma vez que foram disponibilizados várias diluições de diferentes genótipos de VPH, representados no ANEXO 6.

3.5.2 Primers

O desenho dos *primers* para um determinado alvo deve ter em consideração certos requisitos específicos para minimizar erros resultantes das oscilações de eficiência que podem ocorrer. Geralmente devem produzir fragmentos pequenos entre os 20pb-200pb para serem amplificados e trabalhar em regiões com uma constituição de Guanina/Citosina (GC) de 50%, a temperatura de dissociação calculada pelo método de *Breslaver et al* (1986) de cada primer deve apresentar poucas diferenças entre ambos e para diminuir as hipóteses de *mispriming* o terminal 3' não deve apresentar mais de duas bases GC nas últimas 5 bases do terminal, isto porque a interacção das bases GC é mais forte que a interacção das bases Adenina e Timina (AT) e assim pode aumentar as amplificações inespecíficas. A formação de produto

inespecífico pode ser minimizada pelo desenho de *primers* sem estruturas secundárias ou sequências complementares entre o primer *forward* e *reverse*, especialmente no terminal 3'.

Os *primers* SPF10 modificados são constituídos por 7 *primers* (4 *forward* e 3 *reverse*) com tamanhos entre 25 e 26 pb (Quadro 5).

Quadro 5 - Principais características dos *primers* SPF10 utilizados: tamanho, constituição GC, temperatura de dissociação, temperatura de hibridação, peso molecular em gramas por mole, presença de dímeros e *loops* em Kcal por mole.

| Descrição | FORWARD | | | | REVERSE | | |
|------------------------------------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | HP1E | HP1F | HP1G | HP1H | HP2C | HP2D | HP2E |
| Tamanho (nn) | 25 | 25 | 25 | 25 | 26 | 26 | 26 |
| GC (%) | 49 | 44 | 44 | 40 | 38 | 42 | 38 |
| Temperatura de Dissociação (°C) | 64 | 61 | 62 | 60 | 56 | 56 | 56 |
| Temperatura de Hibridação (°C) | 64,2 | 61,7 | 61,9 | 60,2 | 55,8 | 55,0 | 56,5 |
| Peso Molecular (g/mol) | 7735,1 | 7759,1 | 7750,1 | 7734,1 | 7997,3 | 7972,3 | 8006,3 |
| Dímeros (Kcal/mol) | -5,7 | -4,4 | -3,9 | -3,9 | 0 | -5,5 | 0 |
| Loops (Kcal/mol) | -3,7 | -1,5 | -2,0 | -2,0 | 0 | -4,7 | 0 |

Apresentam uma constituição GC que pode variar entre 38 e 49%, uma temperatura de hibridação entre 56°C - 64°C ($\Delta = 8^\circ\text{C}$) e uma temperatura de dissociação entre 57°C - 64°C ($\Delta = 7^\circ\text{C}$).

A especificidade do produto amplificado é avaliada pela verificação da existência de co-amplificações de sequências semelhantes que possam estar contidas na amostra. Esta análise é efectuada pelo alinhamento dos *primers* em *softwares* disponíveis online, nomeadamente o *Basic local alignment search tool (BLAST)*, que permitem que se processe automaticamente uma busca para sequências semelhantes (análise *in silico*). O resultado do alinhamento determina quais os diferentes genótipos de VPH que podem ser detectados pelo ensaio, bem como a especificidade para amplificar sequências que não pertençam ao VPH. O alinhamento foi efectuado segundo as características descritas na Tabela 1.

| <i>Parâmetros</i> | <i>Características</i> |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Base de dados | Sequência de nucleótidos (n/n) |
| Análise | <i>BLASTn</i> |
| <i>Word Size</i> | 7 |
| <i>Max Target Sequences</i> | 500 |
| <i>Expect threshold</i> | 1000 |
| Filtros | Desligado |

Tabela 1 - Descrição dos parâmetros utilizados na ferramenta *BLAST*. As sequências de nucleótidos (*primers*) são comparadas com uma base de dados de nucleótidos (nr/nt) disponível na *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. A análise *BLASTn* avalia cada correspondência com um mínimo de 7 letras (*Word Size*) aumentando a sensibilidade da busca.

A análise estatística do *software BLAST* avalia independentemente cada segmento alinhado. Entre os múltiplos alinhamentos que podem ocorrer para o mesmo sujeito apenas é considerado o alinhamento mais concordante. O resultado é traduzido segundo o valor de *Expect Value (EV)* que ordena os alinhamentos possíveis por valor de concordância com o sujeito. Geralmente, são semelhantes aos valores obtidos de *Maximum Score (MS)* que

classifica o alinhamento mais concordante no conjunto de segmentos alinhados ao mesmo sujeito. O valor de *Maximum Identity* (MI) é a medida em percentagem dos alinhamentos possíveis com o sujeito.

3.5.3 Temperatura de dissociação do VPH

A utilização de uma metodologia de detecção inespecífica, através de corantes não específicos como o SYBR GREEN, tem a vantagem de se conseguir avaliar a especificidade do fragmento amplificado, através da execução da curva de dissociação. O instrumento de PCR em Tempo Real executa automaticamente, após a reacção de amplificação, esta curva de dissociação: Este processo caracteriza-se por um aumento gradual da temperatura, ao mesmo tempo que regista a fluorescência emitida. Este aumento de temperatura provoca a desnaturação de ADN de cadeia dupla, libertando o corante SYBR GREEN e pare a emissão de fluorescência, correspondendo assim a uma diminuição de temperatura. A temperatura de dissociação específica de cada produto é calculada pelo *software* do instrumento através da análise da taxa de variação da fluorescência emitida em função da variação da temperatura aplicada (1ª derivada). O valor em graus célsius do pico obtido da curva parabólica resultante é a temperatura de dissociação que corresponde à temperatura em que encontramos 50% de ADN em cadeia dupla e 50% em cadeia simples.

A formação de dímeros de *primers* pode ocorrer e deve ser monitorizada uma vez que pode interferir com a síntese e detecção do alvo. Os dímeros de *primers* normalmente apresentam temperaturas de dissociação mais baixas do que a temperatura de dissociação da sequência alvo. É esta diferença que vai possibilitar a identificação das interferências possíveis resultantes da formação de dímeros de *primers* ou de outros produtos não específicos resultantes da reacção de amplificação.

3.6 Validação Clínica

A validação clínica tem como principal objectivo avaliar o desempenho da técnica face ao contexto em que o ensaio é maioritariamente utilizado.

Estão descritos cerca de 35 tipos de VPH que infectam a região anogenital no humano. Foram classificados segundo o seu potencial de risco para desenvolver carcinoma. Na nomenclatura proposta por *Muñoz*, agrupa-se cada genótipo do VPH em alto risco, provável alto risco e baixo risco. (Munoz 2003) O cancro do colo está especificamente associado aos genótipos de alto risco, onde os VPH 16/18 são responsáveis por 70% de todos os carcinomas (Hausen 2006). Assim, a prevalência de genótipos de alto risco, presentes em lesões pré-malignas, contribui fortemente para o prognóstico da evolução destas mesmas lesões.

Neste estudo foi utilizada uma população de pacientes do Instituto Português de Oncologia com diagnóstico citológico e/ou histológico classificados segundo a classificação de *Bethesda* e o sistema CIN ANEXO 7. A análise estatística foi elaborada com base na comparação deste diagnóstico e o seu grau de associação ao VPH.

A determinação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foi calculada recorrendo *software* disponível *OpenEpi* (OpenEpi).

4. RESULTADOS

4.1 Análise *in silico*

O *set* de *primers* foi alinhado com o banco de dados disponível *online* na PubMed (NCBI) utilizando a ferramenta de análise BLAST. Os resultados obtidos traduzem quais os genomas do VPH alinhados com o *set* de *primers*. Numa primeira análise, determinou-se quais os tipos de VPH resultantes do conjunto *primer forward/primer reverse*. Os resultados estão representados na tabela 2.

| | PRIMER | REVERSE | | |
|---------|--------|--|---------------------------|--|
| | | HP2C | HP2D | HP2E |
| FORWARD | HP1E | 13, 16, 31, 44, 45, 52, 55, 66, 83, 125 | 6, 6a, 11, 16, 18, 31, 33 | 11, 13, 16, 18, 28, 31, 33, 35, 35h, 44, 45, 51, 52, 56 |
| | HP1F | 13, 16, 18, 31, 44, 45, 55, 58, 66, 69, 83 | 6, 6a, 11, 16, 18, 31, 33 | 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 35h, 44, 45, 56 |
| | HP1G | 11, 13, 16, 18, 26, 31, 33, 43, 44, 45, 53, 55, 66, 83, 113 | 6, 6a, 11, 16, 18, 31, 33 | 13, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 35h, 39, 44, 45, 53, 56, 66, 113 |
| | HP1H | 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 35h, 44, 45, 55, 56, 66, 100, 120, 122 | 6, 6a, 11, 16, 18, 31, 33 | 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 44, 45, 56, 100, 120, 122 |

Tabela 2 - Tipos de VPH resultantes da interação com os diferentes *primers forward* e *reverse* do *set* SPF10. Os diferentes tipos de VPH representados nas suas sequências de referência: VPH 6 (FR751338), VPH 11 (JN644141), VPH 13 (DQ344807), VPH 16 (NC_001526), VPH 18 (X05015), VPH 26 (X74472), VPH 31 (J04353), VPH 33 (M12732), VPH 35 (HQ537730), VPH 39 (U45904), VPH 43 (U12504), VPH 44 (U31788), VPH 45 (U45916), VPH 51 (GQ161722), VPH 52 (X74481), VPH 53 (X74482), VPH 55 (U31791), VPH 56 (M96299), VPH 58 (U45928), VPH 66 (U31794), VPH 69 (AB 27020) e VPH 83 (AF151983).

Segundo a classificação epidemiológica (Munoz 2003) determinou-se quais os VPH de alto e baixo risco possíveis de serem detectados pela técnica. Os resultados estão representados na tabela 3.

| | Tipos de VPH Alinhados com <i>Set de Primers</i> SPF10 modificados |
|-------------|--|
| ALTO RISCO | 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 |
| BAIXO RISCO | 6, 11, 43, 44, 53, 55 |

Tabela 3 – Caracterização dos tipos de VPH de alto e baixo risco possíveis de serem detectados pelo ensaio de PCR em Tempo Real implementado, segundo a classificação proposta por Munoz (Munoz 2003).

4.2 Optimização do protocolo de amplificação

4.2.1 Concentração dos *primers*

A quantidade de *primer* aplicada na reacção de PCR foi optimizada analisando o desempenho do ensaio na amplificação de um controlo positivo para diferentes quantidades de *primer* que variaram desde 40nM-400nM (nanoMolar). Os resultados foram avaliados para o valor de *Ct* e temperatura dissociação obtidas nas diferentes réplicas processadas. Os resultados estão representados na tabela 4.

| Optimização da Concentração dos <i>Primers</i> | | | | | | | | |
|--|------------|-----------|--|-------------|-------------------------|--------------------|----------------|-----------|
| Concentração <i>PRIMERS PCR</i> | | UNID | Valores de <i>Ct</i> (células Siha) | | Temperatura dissociação | | | <i>n</i> |
| <i>FORWARD</i> | REVERSE | | Ct Médio | CV% | <i>Tm</i> Min (°C) | <i>Tm</i> Max (°C) | Δ° | |
| 40 | 40 | nM | 0 | 0 | 61,3 | 91,3 | 30 | 10 |
| 60 | 60 | nM | 0 | 0 | 61,3 | 84,0 | 22,7 | 10 |
| 80 | 80 | nM | 46,53 | 42% | 73,4 | 74,5 | 1,1 | 10 |
| 100 | 100 | nM | 31,95 | 0,4% | 73,6 | 74,0 | 0,4 | 10 |
| 200 | 200 | nM | 33,30 | 0,8% | 73,5 | 73,0 | 0,2 | 10 |
| 300 | 300 | nM | 36,18 | 0,7% | 72,9 | 73,4 | 0,5 | 10 |
| 400 | 400 | nM | 44,22 | 1,5% | 72,6 | 73,4 | 0,8 | 10 |

Tabela 4 – Com as mesmas condições de reacção, fez-se variar a concentração de primers entre 40nM-400nM na mistura de amplificação. Os dados foram analisados em função dos coeficientes de variação obtidos em cada concentração testada. A melhor estimativa verifica-se na concentração de 100nM com o menor valor de *Ct* obtido. Legenda: UNID = unidades; CV = coeficiente de variação; *Tm* = Temperatura dissociação; Min = mínimo; Max = máximo

4.2.2 Optimização da Temperatura de Hibridação

A temperatura de hibridação foi optimizada pela verificação do desempenho do ensaio a temperaturas variáveis entre 60°C e 63°C.

| Cópias de VPH 16 | 60°C | | | | | 62°C | | | | | 63°C | | | | |
|------------------|-----------------|------|-------|------|----------|-----------------|------|-------|-----|----------|-----------------|-------------|--------------|-------------|----------|
| | <i>Ct</i> MÉDIO | DP | CV% | Δ° | <i>N</i> | <i>Ct</i> MÉDIO | DP | CV% | Δ° | <i>N</i> | <i>Ct</i> MÉDIO | DP | CV% | Δ° | <i>N</i> |
| 600E+05 | 21,12 | 0,58 | 2,73% | 0,60 | 4,00 | 15,61 | 0,02 | 0,14% | 0 | 2 | 19,95 | 0,01 | 0,07% | 0,50 | 2 |
| 600E+04 | 21,08 | 1,07 | 5,08% | 0,50 | 4,00 | 19,61 | 0,99 | 5,06% | 0 | 4 | 26,07 | 0,13 | 0,52% | 0,00 | 2 |
| 600E+03 | 24,29 | 1,36 | 5,60% | 1,80 | 4,00 | 24,03 | 0,39 | 1,62% | 0 | 4 | 30,37 | 0,13 | 0,44% | 0,00 | 2 |
| 600E+02 | 29,01 | 0,60 | 2,06% | 0,20 | 4,00 | 28,32 | 0,34 | 1,21% | 0 | 4 | 35,23 | 0,03 | 0,08% | 0,00 | 2 |
| 600E+01 | 33,10 | 0,08 | 0,25% | 1,10 | 4,00 | 32,17 | 0,25 | 0,77% | 0 | 4 | 41,13 | 2,04 | 4,95% | 0,00 | 2 |
| 600E+00 | 36,59 | 1,28 | 3,50% | 0,60 | 4,00 | 36,61 | 1,45 | 3,95% | 0,3 | 4 | 43,64 | 0,52 | 1,20% | 0,00 | 2 |
| 600E-01 | 41,31 | 1,70 | 4,11% | 0,50 | 4,00 | 39,65 | 2,06 | 5,18% | 0,2 | 4 | 44,37 | 0,00 | 0,00% | 8,30 | 1 |
| 600E-02 | 44,18 | 2,19 | 4,95% | 0,40 | 4,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0 | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00% | 0,00 | 0 |

Tabela 5 – A amostra positiva (células caSki) foi processada nas mesmas condições de PCR onde se fez variar a temperatura de hibridação: 60°C, 62°C e 63°. A estimativa para uma melhor sensibilidade do ensaio foi conseguida a uma temperatura de 60°C, com um valor de *Ct* determinado até uma concentração de 6 cópias de VPH 16.

4.3 Sensibilidade Analítica

Foram distribuídos dois painéis de participação (2008 e 2010). Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 6. Foram testadas diferentes concentrações, desde 5 unidades internacionais (UI) (1 UI = 1 cópia de vírus) (NIBSC 2010) (NIBSC 2010) a 500 UI por reacção, em 17 genótipos diferentes de VPH.

| VPH | IU/reacção |
|-------------|-------------------|
| 6 | 50 |
| 11 | 50 |
| 16 | 5 |
| 18 | 5 |
| 31 | 50 |
| 33 | 50 |
| 35 | 50 |
| 39 | 500 |
| 45 | 50 |
| 51 | 50 |
| 52 | 50 |
| 56 | 50 |
| 58 | 50 |
| 59 | 50 |
| 66 | 50 |
| 68 | 50 |
| 68ME | 50 |

Tabela 6 – Determinação dos limites de detecção por cada genótipo de VPH em UI/reacção. Estes resultados foram obtidos através do processamento das amostras distribuídas nos painéis de 2008 e 2010 pelo o programa disponibilizado pela WHO LABNET.

4.4 Precisão do ensaio

Para a avaliação da precisão do resultado obtido pelo ensaio avaliou-se os coeficientes de variação obtidos dos valores de Ct do controlo positivo e de amostras de pacientes que foram detectadas para um determinado genótipo de VPH.

Cada amostra foi processada pelo ensaio de PCR em Tempo Real em três dias diferentes e em triplicado cada amostra processada e em duplicado o controlo positivo. Foi registado cada valor de Ct obtido por réplica.

A tabela 7 caracteriza a variabilidade (%CV) intra e inter-ensaio do controlo positivo (células SiHa: ADN extraído a partir de 5×10^6 células).

| Concentração de vírus (VPH 16) | INTRA-ENSAIO | | | | INTER-ENSAIO | | | |
|-----------------------------------|--------------|------|-------|---|--------------|------|------|---|
| | MEDIA | DP | %CV | n | MEDIA | DP | %CV | n |
| 120000 | 24,89 | 0,34 | 1,36% | 2 | 27,44 | 2,04 | 7,4% | 6 |
| 12000 | 29,06 | 0,30 | 1,02% | 2 | 31,70 | 2,06 | 6,5% | 6 |
| 1200 | 33,33 | 0,25 | 0,76% | 2 | 35,87 | 2,02 | 5,6% | 6 |
| 120 | 38,01 | 1,46 | 3,83% | 2 | 40,44 | 3,22 | 8,0% | 4 |
| 12 | 46,71 | 1,50 | 3,21% | 2 | 46,14 | 1,29 | 2,8% | 4 |

Tabela 7 - Valores do Coeficiente de Variação obtidos com o processamento do mesmo analito (controlo positivo: células SiHa) a diferentes concentrações. Avaliou-se o desempenho intra e inter-ensaios.

A tabela 8 caracteriza a variabilidade (%CV) intra e inter-ensaio em diferentes amostras para um determinado genótipo de VPH identificado previamente por *kits* comerciais.

| AMOSTRAS | | INTRA-ENSAIO | | | | INTER-ENSAIO | | | |
|--------------|--|--------------|------|------|---|--------------|------|------|---|
| GENÓTIPO VPH | | MEDIA | DP | %CV | n | MEDIA | DP | %CV | n |
| 6 | | 31,62 | 0,21 | 0,7% | 3 | 32,62 | 0,99 | 3,0% | 9 |
| 11 | | 26,36 | 0,31 | 1,2% | 3 | 26,96 | 0,95 | 3,5% | 9 |
| 16 | | 42,48 | 2,49 | 5,9% | 3 | 44,11 | 3,05 | 6,9% | 9 |
| 18 | | 17,57 | 1,40 | 8,0% | 3 | 18,92 | 1,26 | 6,6% | 9 |
| 26 | | 33,35 | 0,29 | 0,9% | 3 | 34,15 | 1,11 | 3,3% | 9 |
| 31 | | 18,11 | 0,32 | 1,8% | 3 | 18,80 | 0,72 | 3,8% | 9 |
| 39 | | 34,51 | 1,00 | 2,9% | 3 | 35,94 | 1,35 | 3,8% | 9 |
| 58 | | 35,39 | 0,34 | 0,9% | 3 | 36,71 | 1,05 | 2,9% | 9 |

Tabela 8 - Coeficiente de Variação calculado (%CV) entre as réplicas Intra e Inter-ensaios de amostras com diferentes Genótipos de VPH detectados.

4.5 Validação do ensaio em contexto Clínico

4.5.1 Caracterização da população de estudo

Foi obtida a partir de uma amostragem aleatória simples, de pacientes que deram entrada no Instituto Português de Oncologia, diagnosticados com diferentes lesões associadas à presença do vírus do VPH. Foram estabelecidos como critérios de inclusão todos os pacientes com diagnóstico confirmado. A população é representada pelo sexo feminino com uma idade média de 44 anos. Para esta análise foram avaliadas 1044 amostras do colo do útero (esfregaços e biópsias). A Distribuição das amostras por diagnóstico citológico e histológico está demonstrada no gráfico 1.

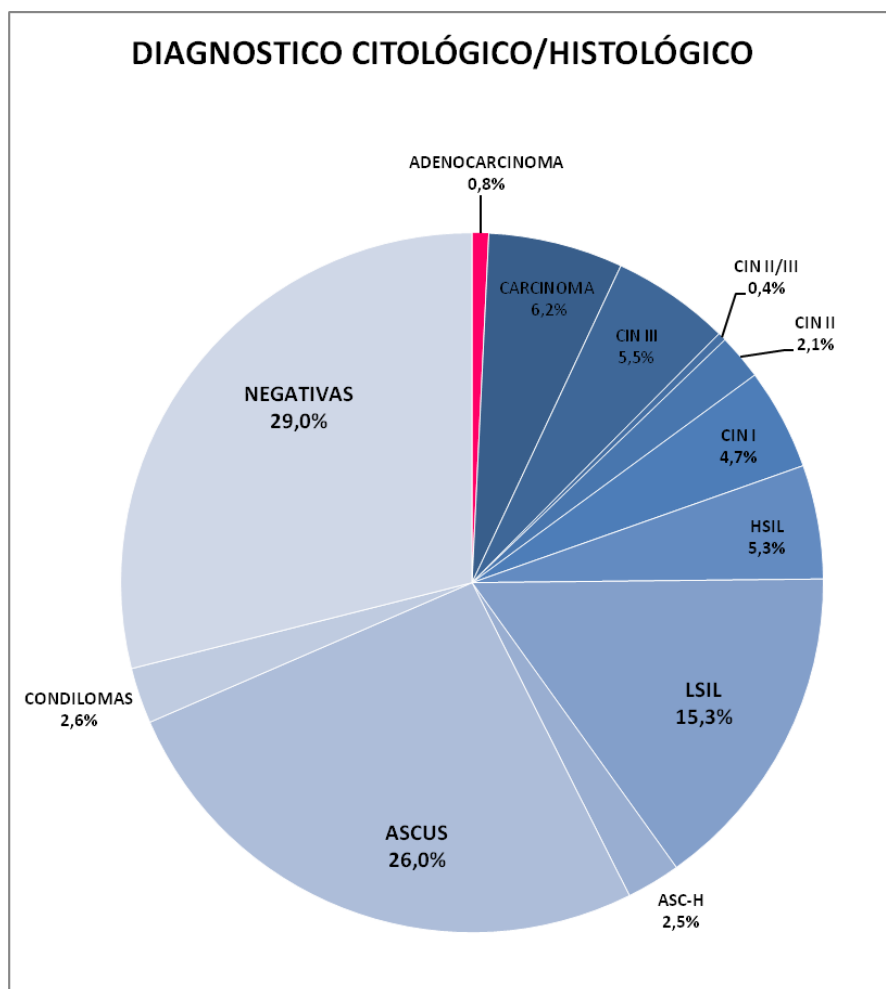


Gráfico 1 - Distribuição das amostras por diagnóstico citológico ou histológico. No total das amostras 0,8% (8/1044) foram diagnosticadas com Adenocarcinoma, 6,2% (65/1044) com Carcinoma, 5,5% (57/1044) com CIN III (neoplasia intra-epitelial do colo grau 3), 0,4% (4/1044) com CIN II/III, 2,1% (22/1044) com CIN II (neoplasia intra-epitelial do colo grau 2), 4,7% (49/1044) com CIN I (neoplasia intra-epitelial do colo grau 1), 5,3% (55/1044) com HSIL (lesão intra-epitelial escamosa de alto grau), 15,3% (160/1044) com LSIL (lesão intra-epitelial escamosa de baixo-grau), 2,5% (26/1044) com ASC-H (células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau), 26% (271/1044) com ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminada), 2,6% (27/1044) com condilomas, 29,0% (303/1044) com citologias negativas.

No total da população estudada foram identificadas 12 tipos de lesões: 6 provenientes de resultados citológicos e 6 provenientes de resultados histológicos. Os diagnósticos estão associados à presença do VPH em 40,2% (420/1044) das amostras e em 60,1% (627/1044) são diagnósticos negativos, ou seja, diagnósticos que podem ou não estar, associadas à presença do VPH, mas num grau de associação menos significativo.

4.5.2 Resultados Qualitativos ADN VPH

O resultado qualitativo obtido da detecção do VPH nas diferentes amostras da população de estudo encontra-se traduzido no gráfico 2.

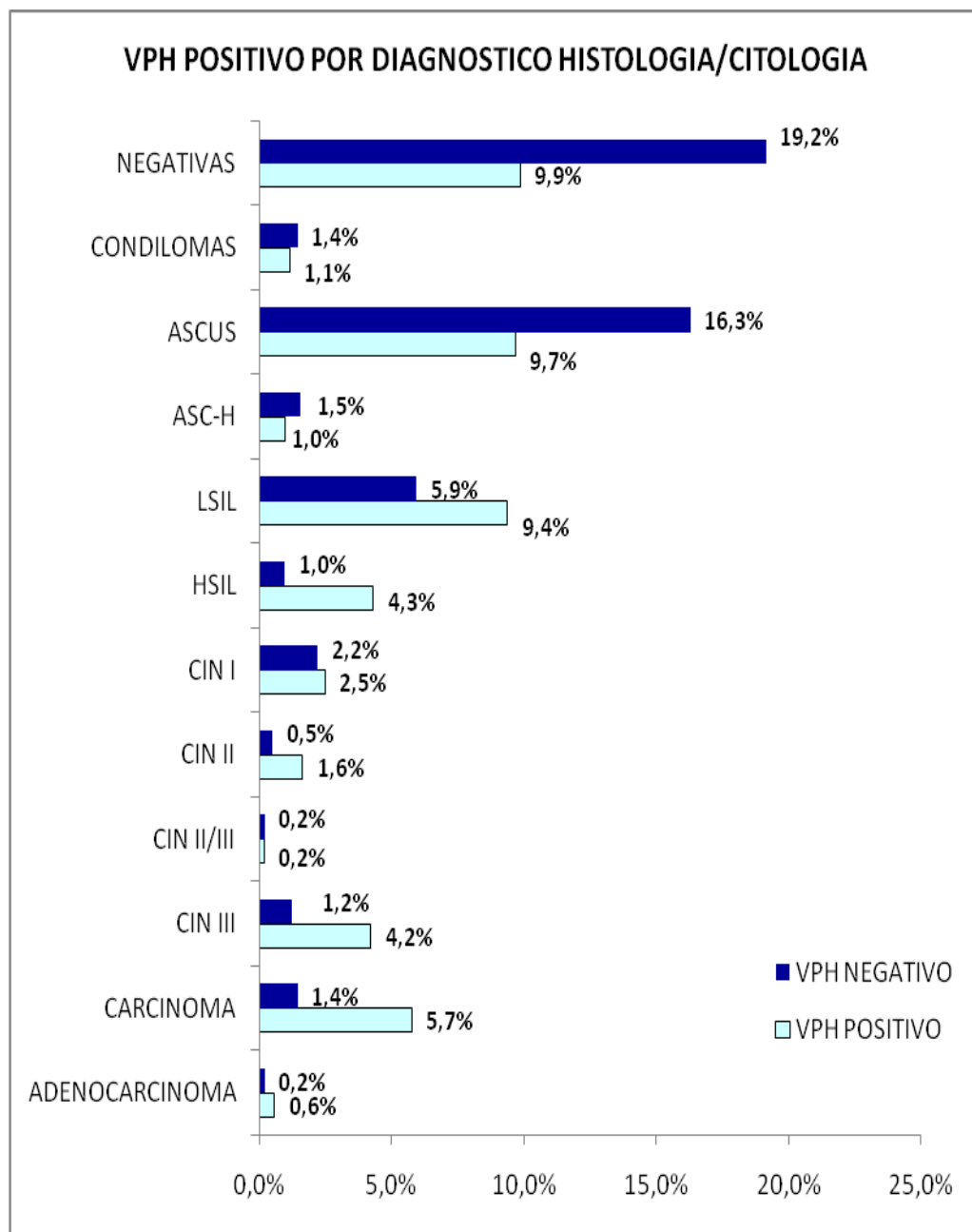


Gráfico 2 – Representação dos resultados qualitativos obtidos para a detecção do ADN VPH. Determinação da frequência de amostras positivas e negativas por tipo de lesão diagnosticada. No total de amostras analisadas, obteve-se 52.3% (548/1044) de amostras detectadas e 47.7% (500/1044) de amostras não detectadas para o VPH. A frequência de positivos é mais elevada do que a frequência de negativos nos adenocarcinomas com 0.6% (6/1044) de amostras positivas para o ADN do VPH, 5.7% (60/1044) nos Carcinomas, 4.2% (44/1044) nos CIN III, 1.6% (17/1044) nos CIN II, 2.5% (26/1044) nos CIN I, 4.3% (45/1044) nos HSIL e 9.4% (98/1044) nos LSIL. A frequência de negativos é mais elevada que a frequência dos positivos no ASC-H com 1.5% (16/1044) de amostras negativas para o ADN do VPH, 16.3% (170/1044) nos ASCUS, 1.4% (15/1044) nos condilomas e em 19.2% (200/1044) nos negativos.

4.5.3 Análise Estatística

A validação clínica foi elaborada com base nos resultados qualitativos (“Detectado” ou “Não Detectado” para a presença do VPH) comparativamente com o diagnóstico citológico ou histológico obtido e o seu grau de associação à presença do VPH. De acordo com os vários estudos publicados (Lorincz 2011) o grau de associação entre o VPH e o diagnóstico clínico é feito ao nível de CIN 2+: ou seja, a capacidade que o ensaio a PCR tem de detectar lesões/doença com diagnóstico igual ou superior a CIN II (CIN 2+). O tratamento estatístico foi efectuado recorrendo ao software OPEN-EPI/Diagnostico screening test Evaluation (www.openEpi.com). Calculou-se os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, que nos permite determinar o desempenho do ensaio e da sua possível utilização como método complementar de diagnóstico (Tabela 9).

| Parâmetro | CUTT-OFF \geq CIN 2+ | | Método |
|--------------------------|------------------------|---------------------|--------------|
| | Estimativa | Intervalo Confiança | |
| | % | 95% | |
| Sensibilidade | 85.58% | (80.16, 89.71) | Wilson Score |
| Especificidade | 58.13% | (54.76, 61.43) | Wilson Score |
| Valor preditivo Positivo | 33.71% | (29.81, 37.85) | Wilson Score |
| Valor preditivo Negativo | 94.19% | (91.82, 95.9) | Wilson Score |

Tabela 9 – Estimativa dos valores obtidos de especificidade, sensibilidade, VPP e VPN e os respectivos intervalos de confiança calculados pelo método *Wilson Score*.

4.5.4 Comparação com outros métodos laboratoriais

Previamente à implementação em rotina do ensaio de PCR em tempo real, este foi validado por comparação com o ensaio anteriormente implementado no laboratório:

- Amplificação do VPH por PCR, usando os *primers* GP5+/GP6+
- Genotipagem do VPH por PCR/RFLP's, usando os *primers* MY09/MY11 ou pela utilização de *Kits* comerciais.

Nesta validação foram processadas 186 amostras, provenientes de patologia do colo do útero.

A relação entre ambos os ensaios encontra-se descrita na tabela 10:

| | | PCR em Tempo Real | | |
|--------------------------|---------------|-------------------|---------------|-----|
| | | Detectado | Não Detectado | |
| <i>Primers</i> GP05/GP06 | Detectado | 75 | 6 | 81 |
| | Não Detectado | 26 | 79 | 105 |
| TOTAL | | 101 | 85 | 186 |

Tabela 10 - Relação dos resultados obtidos em ambos os ensaios.

| | PCR Clássico | | PCR em tempo Real | |
|-----------------------|--------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | GP05/06 | | SYBR GREEN | |
| | ≥ CIN II | | ≥ CIN II | |
| | Valor | Intervalo Confiança | Valor | Intervalo Confiança |
| Sensibilidade | 57.14% | (44.14, 69.23) | 62.5% | (49.41, 73.99) |
| Especificidade | 62.31% | (53.74, 70.17) | 49.23% | (40.78, 57.72) |
| VPP | 39.51% | (29.57, 50.39) | 34.65% | (26.09, 44.34) |
| VPN | 77.14% | (68.24, 84.13) | 75.29% | (65.17, 83.24) |

Tabela 11 – Estimativa dos valores de Sensibilidade e especificidade clínica determinada para cada um dos ensaios.

Comparando ambos os ensaios, verificamos que possuem valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN semelhantes, com a vantagem de se conseguir efectuar a genotipagem em mais amostras com o ensaio de PCR em tempo real.

5. Discussão

A detecção do vírus do VPH em laboratório por técnicas moleculares sofreu uma grande evolução ao longo dos últimos anos. Inicialmente por PCR clássico, onde eram utilizados dois *set* de *primers* consenso (GP05/GP06 e MY09/MY10).

Após pesquisa da literatura de referência, relativamente às diferentes metodologias existentes para efectuar o *screening* inicial de todas as amostras que dão entrada no laboratório, para o VPH, optou-se pela metodologia descrita por Payan *et al.* Esta é baseada na detecção do VPH, usando *primers* SPF10, com modificações de modo a poder ser adaptada para o PCR em Tempo Real, uma metodologia mais robusta e com grandes vantagens ao nível de fluxo de trabalho e manipulação de amostras.

A validação *in silico*, efectuada de acordo com estabelecido em literatura de referência para técnicas de PCR em Tempo Real, permitiu verificar quais os genótipos que esta metodologia consegue detectar: esta validação demonstrou que a técnica permite a detecção de cerca de 30 genótipos de VPH, no entanto apenas se deu relevância aos que infectam as mucosas (região anogenital).

Por outro lado, a utilização de painéis de programas de Avaliação Externa de Qualidade, mais concretamente da OMS (WHO LABNET), permitiu-nos verificar qual a sensibilidade analítica real da nosso ensaio de PCR em Tempo Real, uma vez que foram disponibilizados várias diluições de diferentes genótipos de VPH. Os resultados mostram que este ensaio de PCR em Tempo Real apresenta uma excelente sensibilidade para os genótipos de VPH mais prevalentes em Portugal: VPH 16 (5 UI/reac.), VPH 18 (5 UI/reac.), VPH 31 (50 UI/reac.), VPH 45 (50UI/reac.), VPH 51 (50 UI/reac.), VPH 52 (50 UI/reac.), VPH 53 (50 UI/reac.), VPH 58 (50 UI/reac.), VPH 59 (50 UI/reac.) e VPH 66 (50 UI/reac.). Estes 10 genótipos de VPH estão presentes em 88.4% das infecções a VPH (Pista 2009). De relevar que só os VPHs

16 e 18 estão presentes em 68% dos carcimonas de células escamosas do colo do útero (referência Bosch 2008 Vaccine 26S).

A validação analítica e a utilização em rotina permitiu ainda verificarem a robustez da técnica de PCR em Tempo Real. O controlo positivo (produzido no laboratório através de cultura de células) permitiu verificar qual a variabilidade do ensaio (inter- e intra), igualmente verificada ao nível das amostras com diferentes genótipos de VPH. De relevar, que a validação, onde se define exactamente qual a sensibilidade, especificidade, VPN e VPP do ensaio de PCR em Tempo Real, foi realizado em amostras colhidas da região anogenital.

A validação inicial da técnica, por comparação com a técnica implementada em rotina (técnica de PCR, *primers* GP05/06) permitiu evidenciar a comparabilidade das técnicas (Clássico vs Tempo Real), especificamente ao nível dos critérios de validação clínica, nos quais eram bastante semelhantes, quer ao nível da sensibilidade e especificidade, quer ao nível do valor preditivo negativo e positivo, para a detecção de lesões de CIN II+.

A validação clínica apresenta valores de sensibilidade e especificidade que comparativamente a outros testes para a detecção do VPH (por exemplo: ABBOTT, Cervista e Aptima) e o valor de citologia, o ensaio *in house* é uma ferramenta a usar em teste de primeira linha.

Uma das mais-valias deste estudo é a implementação de um ensaio que disponibiliza inovação à técnica laboratorial na detecção deste vírus, com resultados bastante fiáveis. A caracterização dos parâmetros de análise intrínsecos ao ensaio permite a correcta monitorização com diminuição de erros e falhas.

Este ensaio apresenta um excelente VPN (94%), garantindo-nos que, para a sensibilidade do ensaio para cada um dos genótipos, não são emitidos resultados falsos negativo. Deste modo, todas as amostras com VPH são detectadas, possibilitando a sua genotipagem.

É de revelar também, que este ensaio tem custos reduzidos o que o torna candidato a um teste de primeira linha para o carcinoma do colo, bem como para outros tipos de lesões, nomeadamente da cabeça e pescoço. Por outro lado, a genotipagem é possível pela utilização combinada de *kits* comerciais de genotipagem do VPH e que permite assim, apenas a

genotipagem das amostras positivas para o VPH, o que também permite redução de custos laboratoriais e clínicas.

Como todos os outros testes não determina se há ou não actividade viral, se a infecção é transitória ou persistente. Não é um marcador de doença, é um teste que nos dá segurança de dizer que uma amostra não tem presença de cópias de ADN de VPH acima do limite de detecção.

Fica em aberto o estudo numa população mais específica ao âmbito ML nomeadamente em crianças com suspeita ou situação de abuso sexual confirmada, com intuito de contribuir para um melhor esclarecimento do tema.

6. Conclusões

O ensaio implementado revelou-se uma excelente ferramenta a utilizar na detecção do VPH presente na mucosa anogenital. Pelos dados aqui demonstrados, é possível aplicar os conhecimentos técnicos adquiridos em vários âmbitos, nomeadamente no contexto médico-legal.

Apesar de não existirem muitos estudos publicados nesta área, a importância do VPH no contexto de abuso sexual infantil ou violações é debatida continuamente, onde é sugerido que apesar de o VPH não poder ser utilizado como um indicador específico, por si só, poderá ter uma aplicação como indicador sugestivo.

O aumento de casos de abuso sexual infantil, associada à grande prevalência do vírus, obriga a colocar sempre a possibilidade da infecção a médio e a longo prazo. Assim, a pesquisa viral deverá sempre ser realizada e contribuir para um melhor conhecimento do papel do VPH nos casos de ASI.

7. Referências

- Baker, Z.-M. Z. C. C. (2006). "Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation." Frontiers in Bioscience **11**: 16.
- Bustin, S. A. (2009). "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." Clinical Chemistry **55**(4): 12.
- Campo, M. S. (2006). Papillomavirus Research. UK, England: Caister Academic Press.
- Clare Davy, J. D. (2005). Human Papillomaviruses: Methods and Protocols. London UK, Humana Press.
- Day, R. M. M. A. M. C. S. P. (2003). Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases. Volume 23 Number 28. N.-N. C. f. C. L. Standards.
- Dillner, E. R. U. J., Ed. (2009). Human papillomavirus laboratory manual. Switerzeland, World Health Organization
- Fraiser, L. D. (1994). "Human Papillomavirus infections in children." Pediatric Annals **23**(7): 6.
- Gravitt PE, M. M. (1992). "Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA." IARC Sci Publ **119**: 12.
- Hausen, Z. (2006). Infections Causing Human Cancer. Germany, Betz-druck GmbH, Darmstadt.
- Invitrogen (2008). Real-Time PCR: From Theory To Practice, Invitrogen Corporation.
- J.C.A Frederick, S. N. (2006). Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases. Approved Guideline. C. a. L. S. Institute.
- Kleter, B. (1998). "Novel Short-Fragment PCR Assay for Highly Sensitive Broad-Spectrum Detection of Anogenital Human Papillomaviruses " American Journal of Pathology **153**(6).

- Laimins, M. B. M. M.-N. L. (2009). "Human Papillomaviruses and the Interferon Response." Journal of Interferon & Cytokine Research **29**(9).
- Lorincz, A. T. (2011). "HPV ADN Testing: Past, Presente and Prespective " HPV Today – Newsletter on Human Papillomavirus **23**.
- Mosciki, A. B. (1996). "Genital HPV infections in children and adolescents." Obstetric Gynecology Clinical North America **23**(3): 12.
- Munoz, N. (2003). "Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer." The New England Journal of Medicine **348**(6): 10.
- NCBI, P. "www.PubMed.gov."
- NIBSC (2010). 1 st WHO international Standard for Human Papillomavirus type 16 DNA. NIBSC 06/202. N. I. f. B. S. a. Control. UK, World Health Organization.
- NIBSC (2010). 1 st WHO international Standard for Human Papillomavirus type 18 DNA. N. I. f. b. s. a. control. UK, World Health Organization. **NIBSC 06/206**.
- Nobre, R. (2009). "Oncoprotein of Novel Human Papillomavirus Type 108 Lacking the E6 Gene Induces Dysplasia in Organotypic Keratinocyte Cultures." Journal of Virology **83**(7): 10.
- Nuovo GJ, L. D., Smith S, Lerner J, Comité SL, Eliezri YD. (1991). "Human papillomavirus segregation patterns in genital and nongenital warts in prepubertal children and adults." American Journal of Clinical Pathology **95**(4): 7.
- Obalek S, J. S., Favre M, Walczak L, Orth G. (1990). "Condylomata acuminata in children: frequent association with human papillomaviruses responsible for cutaneous warts." Journal of the American Academy of Dermatology **23**(2 Pt 1): 8.
- OpenEpi. "www.openEpi.com."
- Payan, C. (2007). "Human Papillomavirus Quantification in Urine and Cervical Samples by using the Mx4000 and LightCycler General Real-time PCR Systems." Journal of Clinical Microbiology **45**(3): 4.

- Pista, A. (2009). "Estudo Cleopatre - Prevalencia do HPV em Portugal."
- Rock, B. (1986). "Genital tract papillomavirus infection in children." Archives Dermatologic **122**(10): 3.
- Sinclair, K., et al (2005). "Anogenital and Respiratory Tract Human Papillomavirus infections - Among children: Age, gender and potencial transmission trough sexual abuse. ." Pediatrics **116**(4): 12.
- Snijders, P. (1990). "The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes " Journal General Virology **71**(1): 8.
- Swinkels, D. W. (2002). "Hemolyses, Elevated Liver Enzymes and Low platelet Count (HELLP) Syndrome as a complication of Preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in Maternal plasma and serum." Clinical Chemistry **48**(4).
- Syrjanen, S. (2000). "Human Papillomavirus infections in children: The potencial role of maternal transmission " Critical Reviews Oral Biology Medicine **11**(2): 5.
- Syrjanen, S. (2010). "Current concepts on HPV infections in children." Acta Pathologica Microbiologica et Imunologica Scandinavia **118**(6-7): 15.
- Villiers, E. M. d. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 10.
- Villiers, E. M. d. (2009). "Characterization of seven novel human papillomaviruses types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions." Journal General Virology **90**(8): 5.
- Walboomers, J. M. M. H., Ana-Maria de Roda (1995). "The use of general primers GP05 and GP06 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR." Journal General Virology **76**: 5.

8. Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Descrição dos parâmetros utilizados na ferramenta <i>BLAST</i> . As sequências de nucleótidos (<i>primers</i>) são comparadas com uma base de dados de nucleótidos (nr/nt) disponível NCBI. A análise <i>BLASTn</i> avalia cada correspondência com um mínimo de 7 letras (<i>Word Size</i>) aumentando a sensibilidade da busca..... | 23 |
| Tabela 2 - Tipos de VPH resultantes da interacção com os diferentes <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> do <i>set</i> SPF10. Os diferentes tipos de VPH representados nas suas sequências de referência: VPH 6 (FR751338), VPH 11 (JN644141), VPH 13 (DQ344807), VPH 16 (NC_001526), VPH 18 (X05015), VPH 26 (X74472), VPH 31 (J04353), VPH 33 (M12732), VPH 35 (HQ537730), VPH 39 (U45904), VPH 43 (U12504), VPH 44 (U31788), VPH 45 (U45916), VPH 51 (GQ161722), VPH 52 (X74481), VPH 53 (X74482), VPH 55 (U31791), VPH 56 (M96299), VPH 58 (U45928), VPH 66 (U31794) VPH 69 (AB 27020) e VPH 83 (AF151983)..... | 26 |
| Tabela 3 – Caracterização dos tipos de VPH de alto e baixo risco possíveis de serem detectados pelo ensaio de PCR em Tempo Real implementado, segundo a classificação proposta por <i>Munoz</i> (Munoz 2003)..... | 27 |
| Tabela 4 – Com as mesmas condições de reacção, fez-se variar a concentração de primers entre 40nM-400nM na mistura de amplificação. Os dados foram analisados em função dos coeficientes de variação obtidos em cada concentração testada. A melhor estimativa verifica-se na concentração de 100nM com o menor valor de <i>Ct</i> obtido. Legenda: UNID = unidades; CV = coeficiente de variação; <i>Tm</i> = Temperatura dissociação; Min = mínimo; Max = máximo | 28 |
| Tabela 5 – A amostra positiva (células caSki) foi processada nas mesmas condições de PCR onde se fez variar a temperatura de hibridação: 60°C, 62°C e 63°. A estimativa para uma melhor sensibilidade do ensaio foi conseguida a uma temperatura de 60°C, com um valor de <i>Ct</i> determinado até uma concentração de 6 cópias de VPH 16..... | 28 |
| Tabela 6 – Determinação dos limites de detecção por cada genótipo de VPH em UI/reacção. Estes resultados foram obtidos através do processamento das amostras distribuídas nos painéis de 2008 e 2010 pelo o programa disponibilizado pela WHO LABNET. | 29 |

| | |
|--|----|
| Tabela 7 - Valores do Coeficiente de Variação obtidos com o processamento do mesmo analito (controlo positivo: células Siha) a diferentes concentrações. Avaliou-se o desempenho intra e inter-ensaios. | 30 |
| Tabela 8 - Coeficiente de Variação calculado (%CV) entre as réplicas Intra e Inter-ensaios de amostras com diferentes Genótipos de VPH detectados. | 31 |
| Tabela 9 – Estimativa dos valores obtidos de especificidade, sensibilidade, VPP e VPN e os respectivos intervalos de confiança calculados pelo método <i>Wilson Score</i> | 34 |
| Tabela 10 - Relação dos resultados obtidos em ambos os ensaios. | 35 |
| Tabela 11 – Estimativa dos valores de Sensibilidade e especificidade clínica determinada para cada um dos ensaios. | 35 |
| Tabela 12 – Tabela de resultados das amostras distribuídas nos painéis de 2008 e 2010 pela WHO LABNET, com o ensaio de PCR em tempo real implementado na detecção qualitativa do ADN do VPH. | 51 |
| Tabela 13– Limite de detecção por genótipo de VPH para o Kit <i>Papillocheck</i> e INNO-LIPA. | 53 |

9. Índice de Quadros

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Principais fontes de erro nas diferentes etapas dos ensaios com ácidos nucleicos (Day 2003). | 13 |
| Quadro 2 - Constituição dos oligonucleótidos do <i>Set de Primers</i> SPF10. | 15 |
| Quadro 3 - Programa de Amplificação e Detecção do VPH e gene Albumina | 17 |
| Quadro 4- Metodologia de Implementação e Monitorização estabelecida para o ensaio de PCR em Tempo Real para a detecção do VPH em laboratório. | 19 |
| Quadro 5 - Principais características dos <i>primers</i> SPF10 utilizados: tamanho, constituição GC, temperatura de dissociação, temperatura de hibridação, peso molecular em gramas por mole, presença de dímeros e <i>loops</i> em Kcal por mole. | 22 |
| Quadro 6 - <i>Primers</i> para detecção do gene humano da albumina. | 46 |

| | |
|--|----|
| Quadro 7 – Classificação Bethesda e Sistema CIN..... | 51 |
|--|----|

10. Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das amostras por diagnóstico citológico ou histológico.No total das amostras 0.8% (8/1044) foram diagnosticadas com Adenocarcinoma, 6.2% (65/1044) com Carcinoma, 5.5% (57/1044) com CIN III (neoplasia intra-epitelial do colo grau 3), 0.4% (4/1044) com CIN II/III, 2.1% (22/1044) com CIN II (neoplasia intra-epitelial do colo grau 2), 4.7% (49/1044) com CIN I (neoplasia intra-epitelial do colo grau 2), 5.3% (55/1044) com HSIL (lesão intra-epitelial escamosa de alto grau), 15.3% (160/1044) com LSIL (lesão intra-epitelial escamosa de baixo-grau), 2.5% (26/1044) com ASC-H (células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau), 26% (271/1044) com ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminada), 2.6% (27/1044) com condilomas, 29.0% (303/1044) com citologias negativas..... 32

Gráfico 2 – Representação dos resultados qualitativos obtidos para a detecção do ADN VPH. Determinação da frequência de amostras positivas e negativas por tipo de lesão diagnosticada. No total de amostras analisadas, obteve-se 52.3% (548/1044) de amostras detectadas e 47.7% (500/1044) de amostras não detectadas para o VPH. A frequência de positivos é mais elevada do que a frequência de negativos nos adenocarcinomas com 0.6% (6/1044) de amostras positivas para o ADN do VPH, 5.7% (60/1044) nos Carcinomas, 4.2% (44/1044) nos CIN III, 1.6% (17/1044) nos CIN II, 2.5% (26/1044) nos CIN I, 4.3% (45/1044) nos HSIL e 9.4% (98/1044) nos LSIL. A frequência de negativos é mais elevada que a frequência dos positivos no ASC-H com 1.5% (16/1044) de amostras negativas para o ADN do VPH, 16.3% (170/1044) nos ASCUS, 1.4% (15/1044) nos condilomas e em 19.2% (200/1044) nos negativos..... 33

11. Índice Figuras

Figura 1 - Representação da organização do genoma completo do VPH16. LCR região reguladora. Genes da região *early* que codificam as proteínas precoces: E6, E7, E1, E2, E4, E5. Genes da região *late* que codificam os genes tardios: L2 e L1. (Baker 2006) 9

Figura 2 - Árvore filogenética dos genótipos de VPH descritos. Nomenclatura proposta *Ethel-Villiers*. O número terminal presente em cada braço identifica o tipo de VPH, os números

associados à letra “c” são considerados como candidatos a novo tipo de VPH. Todas as outras abreviaturas referem-se aos Papilomas dos animais. Os semi-círculos externos maiores representam os géneros, denominados pelas letras do alfabeto grego. Os números dos semi-círculos internos denominam a espécie do tipo de Papilomavírus. (Villiers 2004) 10

12. Anexos

ANEXO 1- PREPARAÇÃO E EXTRACÇÃO DO ADN

PARTE I: PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Estes procedimentos foram otimizados e adaptados a cada produto de forma a se conseguir uma melhor rentabilização do método de extracção aplicado. Diga-se rentabilização na obtenção de quantidade de ADN extraído com a máxima pureza oferecida pelo Kit utilizado. Numa primeira fase recolhe-se as células de cada produto, sendo os esfregaços líquidos por meio de centrifugação, as biopsias pela fragmentação de uma pequena porção e as zaragatoas por imersão em soro fisiológico durante 2 horas. As células recolhidas são lavadas com soro fisiológico e armazenadas sob *pellet* seco que está pronto a ser utilizado. São armazenadas num *ependorff* de 1.5 ml, podendo ser conservadas a -20°C.

PARTE II: EXTRACÇÃO DO ADN

O ADN viral é extraído pelo *QIAMP MiniElute Virus Kit* da QIAGEN, uma técnica manual em sistema de colunas para extrair ácidos nucleicos de soro, plasma e tecidos. O princípio da técnica baseia-se na recolha de ADN numa membrana de sílica a partir de um lisado da amostra. Seguidamente o ADN retido na membrana é lavado com dois buffers e uma última lavagem com etanol absoluto. A membrana é seca no bloco térmico a 56° durante 3 minutos para que todo o etanol evapore. A técnica é executada conforme o recomendado na bula do fabricante no que diz respeito a quantidades de reagentes e procedimento das diferentes etapas de extracção. Optimizou-se no protocolo essencialmente o tempo de lise com *proteinase K* onde se adoptou uma lise *overnight* ao invés dos 15 minutos descritos na respectiva bula. A amostra é eluída em 50µl de tampão AVE que faz com que o ADN se desprenda da membrana e fique recolhido no *ependorff*. O kit oferece um intervalo de volumes de eluição que se podem aplicar. O volume de 50µl foi acertado para que se obtivesse a concentração mínima necessária de ADN extraído para o procedimento da técnica de amplificação.

ANEXO 2 – PREPARAÇÃO DE CONTROLOS POSITIVOS

PREPARAÇÃO DO CONTROLO POSITIVO

As células são derivadas essencialmente de carcinomas: as células *CaSki* provenientes de uma metástase de carcinoma do colo do útero. Estão infectadas com o genótipo VPH 16 em aproximadamente 600 cópias por célula. As células *SiHa* são derivadas de um carcinoma de células escamosas do colo do útero, de grau 2, contendo 1 a 2 cópias do genótipo VPH 16 integrado no genoma. As células *HeLa* são derivadas de um carcinoma do colo do útero que contem 50 a 300 cópias de VPH 18 por célula.

São mantidas em cultura por monocamada. Este processo envolve a subcultura em frascos, tripsinização com contagem de células, criopreservação e descongelação. As linhas celulares são compradas externamente. Cada alíquota é preparada e mantida em cultura a uma temperatura de 37° com 5% CO₂. Periodicamente recolhem-se as células por meio de centrifugação, sendo armazenadas alíquotas de 1 milhão (1×10^6) de células em *pellet* seco a -80°C.

PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Foram usados Plasmídeos de HPV 16 e HPV 18, com as referências NIBSC 06/202 e 06/206, apresentando uma concentração final de 1×10^7 IU/ml. Foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e armazenadas a -20° C.

ANEXO 3 – PREPARAÇÃO DOS PRIMERS

São fornecidos pela *Applied Biosystems* (10 nanomoles). Os *primers* são armazenados liofilizados e à temperatura de -20° C. Inicialmente é reconstituída uma solução *stock* que se encontra 10× concentrada relativamente à solução de trabalho. Os diferentes primer *Forward* e *Reverse* são diluídos de modo a ficarem numa concentração de 2.5pmol/ul.

ANEXO 4 – DESCRIÇÃO PRIMERS E SONDA DO GENE ALBUMINA

Quadro 6 - *Primers* e sonda para detecção do gene humano da albumina

| REAGENTES | CONCENTRAÇÃO FINAL | QUANTIDADE (µl) |
|--|--------------------|----------------------|
| Primer forward <u>5'TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT3'</u> | 2.5 pmol | 1 |
| Primer reverse <u>5'CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT 3'</u> | 2.5 pmol | 1 |
| Sonda <u>5'VIC-TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGA-TAMRA-3</u> | 2.5 pmol | 1 |
| Master Mix | - | 12.5 |
| Água Pura | - | 1.5 |
| TOTAL | - | 20 µl/reacção |

ANEXO 5 – PREPARAÇÃO DA MIX DE AMPLIFICAÇÃO

A mistura de amplificação é preparada com os seguintes constituintes: *MasterMix* SYBR GREEN da *Applied Biosystems*, *primers* SPF10 modificados, uracil DNA-*glycosylase* e água bidestilada estéril. Esta mistura de amplificação é preparada numa câmara de fluxo laminar e numa área de pré-amplificação. É adicionada num volume de 20µl com 5µl de amostra extraída.

| REAGENTES | CONCENTRAÇÃO FINAL | QUANTIDADE (µl) |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| Primer forward (Mistura) | 2.5 pmol | 1 |
| Primer reverse (Mistura) | 2.5 pmol | 1 |
| Uracil-DNA Glycosylase | 1 U | 1 |
| Master Mix | - | 12,5 |
| Água Pura | - | 1,5 |
| TOTAL | - | 20 µl/reacção |

ANEXO 6 - RESULTADOS LABNET

| ID amostra | Tipo de VPH | IU/5 ul | SYBR GREEN | ANO PAINEL |
|------------|-------------|---------|------------|------------|
| 8 | 6 | 500 | DET | 2008 |
| 15 | 6 | 50 | DET | 2008 |
| 13 | 6 | 500 | DET | 2010 |
| 33 | 6 | 50 | DET | 2010 |
| 30 | 11 | 500 | DET | 2008 |
| 37 | 11 | 50 | DET | 2008 |
| 21 | 11 | 500 | DET | 2010 |
| 37 | 11 | 50 | DET | 2010 |
| 6 | 16 | 500 | DET | 2008 |
| 17 | 16 | 50 | DET | 2008 |
| 26 | 16 | 5 | DET | 2008 |
| A | 16 | 800 | N/P | 2008 |
| 5 | 16 | 50 | DET | 2010 |
| 23 | 16 | 5 | DET | 2010 |
| A | 16 | 25 | DET | 2010 |
| C | 16 | 2500 | DET | 2010 |
| 1 | 18 | 5 | DET | 2008 |
| 11 | 18 | 500 | DET | 2008 |
| 19 | 18 | 50 | DET | 2008 |
| 8 | 18 | 50 | DET | 2010 |
| 29 | 18 | 5 | DET | 2010 |
| 20 | 31 | 500 | DET | 2008 |
| 29 | 31 | 50 | DET | 2008 |
| 2 | 31 | 500 | DET | 2010 |
| 41 | 31 | 50 | DET | 2010 |
| 2 | 33 | 500 | DET | 2008 |
| 9 | 33 | 50 | DET | 2008 |
| 17 | 33 | 500 | DET | 2010 |

| ID amostra | Tipo de VPH | IU/5 ul | SYBR GREEN | ANO PAINEL |
|------------|-------------|---------|------------|------------|
| 25 | 33 | 50 | DET | 2010 |
| 14 | 35 | 50 | DET | 2008 |
| 25 | 35 | 500 | DET | 2008 |
| 9 | 35 | 500 | DET | 2010 |
| 28 | 35 | 50 | DET | 2010 |
| 39 | 39 | 50 | ND | 2008 |
| 18 | 39 | 50 | ND | 2010 |
| 42 | 39 | 500 | DET | 2010 |
| 24 | 45 | 500 | DET | 2008 |
| 36 | 45 | 50 | DET | 2008 |
| 4 | 45 | 500 | DET | 2010 |
| 34 | 45 | 50 | DET | 2010 |
| 3 | 51 | 500 | DET | 2008 |
| 18 | 51 | 50 | DET | 2008 |
| 12 | 51 | 50 | DET | 2010 |
| 43 | 51 | 500 | DET | 2010 |
| 10 | 52 | 50 | ND | 2008 |
| 21 | 52 | 500 | ND | 2008 |
| 19 | 52 | 500 | DET | 2010 |
| 39 | 52 | 50 | DET | 2010 |
| 33 | 56 | 500 | DET | 2008 |
| 41 | 56 | 50 | DET | 2008 |
| 7 | 56 | 500 | DET | 2010 |
| 24 | 56 | 50 | DET | 2010 |
| 27 | 58 | 500 | DET | 2008 |
| 38 | 58 | 50 | DET | 2008 |
| 14 | 58 | 500 | DET | 2010 |
| 30 | 58 | 50 | DET | 2010 |
| 4 | 59 | 500 | DET | 2008 |
| 13 | 59 | 50 | ND | 2008 |

| ID amostra | Tipo de VPH | IU/5 ul | SYBR GREEN | ANO PAINEL |
|------------|---------------------------------|---------|------------|------------|
| 1 | 59 | 50 | DET | 2010 |
| 38 | 59 | 500 | DET | 2010 |
| 34 | 66 | 500 | DET | 2008 |
| 40 | 66 | 50 | DET | 2008 |
| 15 | 66 | 50 | DET | 2010 |
| 36 | 66 | 500 | DET | 2010 |
| 31 | 68 | 50 | DET | 2008 |
| 20 | 68 | 50 | DET | 2010 |
| 35 | 68 | 500 | ND | 2010 |
| 11 | 11, 16, 31, 33, 58 | 50 | DET | 2010 |
| 22 | 11, 16, 31, 33, 58 | 500 | DET | 2010 |
| 5 | 11,18,31,51 | 500 | DET | 2008 |
| 12 | 11,18,31,51 | 50 | DET | 2008 |
| 16 | 16,33,45,52 | 500 | DET | 2008 |
| 23 | 16,33,45,52 | 50 | DET | 2008 |
| 6 | 35, 59, 66, 68ME | 500 | DET | 2010 |
| 40 | 35, 59, 66, 68ME | 50 | DET | 2010 |
| 28 | 35,39,59,66 | 500 | DET | 2008 |
| 42 | 35,39,59,66 | 50 | DET | 2008 |
| 32 | 39 ^(a) | 500 | ND | 2008 |
| 32 | 39, 45, 52, 56, 68 | 50 | DET | 2010 |
| 16 | 39, 45, 52, 56, 68 ^a | 500 | DET | 2010 |
| 3 | 6, 16, 18, 51 | 500 | DET | 2010 |
| 26 | 6, 16, 18, 51 | 50 | DET | 2010 |
| 35 | 6,56,58,68 | 500 | DET | 2008 |
| 43 | 6,56,58,68 | 50 | DET | 2008 |
| 22 | 68 ^(b) | 500 | ND | 2008 |
| 10 | 68EM | 500 | ND | 2010 |
| 31 | 68ME | 50 | DET | 2010 |
| 27 | NEG | 0 | ND | 2010 |

| ID amostra | Tipo de VPH | IU/5 ul | SYBR GREEN | ANO PAINEL |
|------------|-------------|---------|------------|------------|
| 7 | Negative | None | ND | 2008 |
| B | none | None | N/P | 2008 |
| B | NONE | 0 | ND | 2010 |

Tabela 12 – Tabela de resultados das amostras distribuídas nos painéis de 2008 e 2010 pela WHO LABNET, com o ensaio de PCR em tempo real implementado na detecção qualitativa do ADN do VPH.

ANEXO 7 – CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES DO COLO

Os resultados da citologia são classificados segundo a classificação de *Bethesda* e os histológicos segundo o sistema CIN.

Quadro 7 – Classificação *Bethesda* e Sistema CIN proposto para os resultados citológicos e histológicos.

| Classificação <i>Bethesda</i> | | Sistema CIN |
|---|---|---------------------------------------|
| 1991 | 1999 | |
| Citologia | | Histologia |
| Negativa | | Normal |
| ASCUS (Atypical Squamous Cells Undeterminate Significance) | ASC-US | |
| | ASC-H (sem exclusão de Lesão Alto Grau - HSIL) | |
| AGUS | | |
| L-SIL | L-SIL | CIN I |
| H-SIL | H-SIL | CIN II/ III |
| Carcinoma | Carcinoma | Carcinoma Invasivo células epiteliais |

| | | |
|--|--|----------------|
| | | Adenocarcinoma |
|--|--|----------------|

ANEXO 8 - CARACTERÍSTICAS DOS KITS DE GENOTIPAGEM

O kit *Papillocheck* utiliza uma metodologia em microarrays, tem a capacidade de identificar 24 genótipos de VPH: 15 genótipos de alto risco (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) 2 de provável alto risco (VPH 53 e 66) e 7 de baixo risco (VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44/55, 70).

O Kit INNO-LIPA utiliza uma metodologia em LiRAS, tem a capacidade de detectar 28 genótipos diferentes de VPH: 15 de alto risco (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), 3 de provável alto risco (VPH 26, 53 e 66) e 7 de baixo risco (VPH 6, 11, 26, 40, 43, 44, 54 e 70). Os genótipos VPH 69, 71 e 74 detectados pelo kit não se encontram classificados.

O limite de detecção para os diferentes genótipos de VPH identificados por cada um dos *kits* estão representados na tabela 3, usando o programa de AEQ WHO LABNET. Na ausência de genotipo distribuído por este programa, os valores são os indicados nas respectivas bulas.

| GENÓTIPO VPH | RESULTADOS LABNET | |
|--------------|-------------------|----------------|
| | PaPillocheck | INNO-LIPA |
| | Cópias/reacção | Cópias/reacção |
| 6 | 50 | 50 |
| 11 | 50 | 50 |
| 16 | 5 | 5 |
| 18 | ND (300**) | 5 |
| 26 | NA | ND (1000*) |
| 31 | 500 | 50 |
| 33 | 50 | 50 |
| 35 | 500 | 50 |

| GENÓTIPO VPH | RESULTADOS LABNET | |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | PaPillocheck Cópias/reacção | INNO-LIPA Cópias/reacção |
| 39 | 50 | 50 |
| 40 | ND (30**) | ND (1000*) |
| 42 | ND (30**) | ND (1000*) |
| 43 | ND (100**) | ND (1000*) |
| 44 | ND (30**) | ND (1000*) |
| 45 | 50 | 50 |
| 51 | 50 | 50 |
| 52 | 50 | 50 |
| 53 | ND (30**) | ND (1000*) |
| 54 | NA | ND (1000*) |
| 56 | 50 | 50 |
| 58 | 500 | 50 |
| 59 | 50 | 500 |
| 66 | 50 | 50 |
| 68 | ND (30**) | 500 |
| 70 | ND (30**) | ND (1000*) |
| 73 | ND (100**) | ND (1000*) |
| 82 | ND (30**) | ND (1000*) |

Tabela 13– Limite de detecção por genótipo de VPH para o Kit *Papillocheck* e INNO-LIPA. Legenda:
 * Especificado na bula do kit Inno LIPA; ** Especificado no kit Pappillocheck; NA: não aplicável;
 ND: não determinado